

肝特異的有機アニオントランスポーターLST-2遺伝子の転写調節機構～FXR，HNF1，HNF3 の3つの転写因子は，LST-2遺伝子の転写活性化に必須である

著者	大塚 英郎
号	2052
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10097/22597

氏 名（本籍） おお つか ひで お
大 塚 英 郎

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 博 第 2 0 5 2 号

学位授与年月日 平 成 16 年 3 月 25 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科
（博士課程）医科学専攻

学 位 論 文 題 目 The transcriptional regulation of the liver
specific organic anion transporter : LST-2 gene.
～FXR, HNF1 α , and HNF3 β are essential
for the transcriptional activation of the gene～
（肝特異的有機アニオントランスポーター LST-2
遺伝子の転写調節機構～FXR, HNF1 α , HNF3 β
の 3 つの転写因子は, LST-2 遺伝子の転写活性化
に必須である）

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教授 松 野 正 紀 教授 里 見 進

教授 岡 芳 知

論文内容要旨

肝細胞の類洞側細胞膜上には、種々の有機アニオントランスポーターが発現し、両親媒性物質の選択的輸送を担っている。特に organic anion transporter (OATP) 群は、その広い基質認識性から、血中から胆汁酸のほか、様々な内因性、外因性物質の細胞内への取込みを担っていると考えられている。Liver Specific organic anion Transporter-2 (LST-2) は、申請者らの研究グループが以前に単離した Liver Specific organic anion Transporter-1 (LST-1) に相同性を有する cDNA としてヒト肝臓 cDNA ライブラリーから単離した遺伝子である。正常組織では、肝中心静脈周囲類洞膜側のみに発現しており、Taurocholic acid (TCA), Chenodeoxycholic acid (CDCA) といった胆汁酸のほか、エイコサノイド、包含型ステロイド、甲状腺ホルモン、また、抗癌剤の Methotrexate (MTX) といったさまざまな基質を細胞内に取り込む機能を有することを明らかにしてきた。

肝臓は生体内で最も多彩な代謝機能を有し、生体のホメオスタシスにきわめて重要な働きをしていると考えられることから、類洞側細胞膜上に発現し、多彩な物質を細胞内に取り込む役割を担うこれらトランスポーターの臓器特異的発現と胆汁うっ滞のような病態時における発現の変化とそのメカニズムはきわめて興味深い。

今回、申請者は臓器特異的発現を有し、肝臓の機能に重要な役割を担っていると考えられる LST-2 の転写調節機構を探るとともに、胆汁うっ滞といった病態時に、その発現がどのように変化するのか、また、一連の胆汁酸代謝のなかでどのような役割を担うのか探るべく研究を遂行した。

申請者は、LST-2 5'上流域約 1500 bp を単離し、プロモーター領域の詳細な検討をおこなった。LST-2 の転写活性には、転写開始点より -180 ~ -20 bp に存在する, farnesol X receptor (FXR), hepatocyte nuclear factor 3 β (HNF3 β), hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α) の認識配列それぞれがきわめて重要であることがわかった。さらに EMSA にて、これらの配列にそれぞれの転写因子が結合することを証明した。LST-2 の転写活性化機構の中で、FXR, HNF3 β , HNF1 α の 3 つの転写因子がきわめて重要な役割を担っていると考えられた。

肝臓での、臓器特異的な遺伝子の発現に、数種類の肝臓に豊富に存在する転写因子 (Liver Enriched transcriptional families ; LETFs) が深く関与することが言われている。HNF1 α , HNF3 β はいずれも肝臓に特異的に発現する転写因子ではなく、多臓器にも広く存在するとされるが、LETFs の転写因子とされる。これら 2 つの転写因子が、LST-2 の肝臓における特異的な発現にきわめて重要である可能性が示唆された。

胆汁酸の LST-2 転写におよぼす影響を調べるため、各種胆汁酸を添加した際の転写活性の変

化をルシフェラーゼアッセイで検討した。CDCA, DCA を 100 μ M で加えるとルシフェラーゼ活性が約 5 ～ 6 倍と著明に上昇し, LCA, UDCA では約 2 倍と軽度上昇, CA, TCA では変化は認められなかった。さらに, vector 上で FXR の結合配列に mutation を入れると CDCA, DCA によるルシフェラーゼ活性の上昇は認められなくなることから, 胆汁酸による転写活性化は FXR によると考えられた。

さらに正常肝細胞における胆汁酸の, LST-2 の発現に及ぼす影響を検討するため, 正常肝細胞由来細胞株 THLE-3 をもちい, 培養液中に CDCA または DCA を 0～100 μ M 添加し, total RNA を抽出, Northern blot 法にて LST-2 mRNA 量の変化を検討した。LST-2 mRNA は胆汁酸濃度依存性に増加することが明らかになった。さらに, DCA 100 μ M を添加し培養を行うことで細胞膜上に LST-2 蛋白の発現が増加することを Western blot 法にて確認した。

胆汁うっ滞時, 細胞外胆汁酸濃度が高い環境下で LST-2 の発現は増加すると考えられるが, これは取り込み側のトランスポーターとして, きわめて特徴的な LST-2 の性質と考えられる。申請者らのグループにより, CDCA は LST-2 により細胞内に取り込まれることが明らかにされていることから, LST-2 は, 自身の取り込む基質により, 発現が調節されていると考えられた。

審査結果の要旨

近年、肝細胞の類洞側細胞膜上に種々の有機アニオントランスポーターが発現し、両親媒性物質の選択的輸送を担っていることが、あきらかにされつつある。本研究は、臓器特異的発現を有し、肝臓の機能に重要な役割を担っていると考えられる有機アニオントランスポーター；LST-2の転写調節機構を探るとともに、胆汁うっ滞といった病態時に、その発現がどのように変化するか、また、一連の胆汁酸代謝のなかでどのような役割を担うのか検討したものである。

LST-2 5'上流域を単離し、プロモーター領域の詳細な検討をおこなった。LST-2の転写活性には、転写開始点より上流域に存在する、farnesol X receptor (FXR), hepatocyte nuclear factor 3β (HNF 3β), hepatocyte nuclear factor 1α (HNF 1α)の認識配列それぞれがきわめて重要であることをあきらかにした。LST-2の転写活性化機構の中で、FXR, HNF 3β , HNF 1α の3つの転写因子がきわめて重要な役割を担っていることを示した。肝臓での、臓器特異的な遺伝子の発現に、数種類の肝臓に豊富に存在する転写因子 (Liver Enriched transcriptional families; LETFs) が深く関与することが言われている。HNF 1α , HNF 3β はいずれも LETFsの転写因子とされており、これら2つの転写因子が、LST-2の肝臓における特異的な発現にきわめて重要であると考察している。さらに、胆汁酸のLST-2転写におよぼす影響を調べるため、各種胆汁酸を添加した際の転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイで検討した。CDCA, DCAを100 μ Mで加えるとルシフェラーゼ活性が著明に上昇するが、vector上でFXRの結合配列に mutation を入れると、活性の上昇は認められなくなることから、LST-2は胆汁酸によりFXRを介して転写が活性化されることを証明した。正常肝細胞における、胆汁酸のLST-2の発現に及ぼす影響を検討するため、正常肝細胞由来細胞株をもちい、Northern blot法、およびWestern blot法を行った。胆汁酸の細胞培養液中への添加により、LST-2の発現がmRNAレベル、タンパク質レベルで増加することを確認した。

本研究は、肝特異的有機アニオントランスポーター LST-2の臓器特異的発現のメカニズムにひとつの可能性を見いだした。さらにその輸送基質の一つである CDCA や DCA により、転写が活性化することをあきらかにし、肝細胞における胆汁酸代謝において LST-2 がきわめて重要な役割を果たしている可能性を考察した。以上二点において、非常に意義深く独創的であり、学位論文に値する重要な研究であるといえる。